



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 18.V.1964 (P 104 577)

Pierwszeństwo: 27.I.1964 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

Opublikowano: 18.II.1966

Kl. 30 h, 2/04

MKP A 61 k 17/18

UKD

Współtwórcy wynalazku: prof. dr Fritz Markward, dr Peter Walsmann,
dr Gerhard Schäffer, Herst Tipfer

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden Radebeul (Niemiecka Republika Demokratyczna)

Sposób otrzymywania hirudyny o wysokiej czystości

1
Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania hirudyny o wysokiej czystości.

Wiadomo, że pijawka lekarska zawiera substancję hamującą hirudynę, która zapobiega krzepnięciu krwi przez związanie enzymu krzepliwości krwi, trombiny, w ściśle określony związek kompleksowy.

Według znanego sposobu z odwodnionych głów pijawek przez ekstrakcję mieszaniną aceton — woda i frakcjonowane strącanie acetonem, otrzymuje się surową hirudynę, którą oczyszcza się przez elektrodializę, ekstrakcję propanolem i na koniec przez elektroforezę bibułą, wielokrotne wytrącenie etanolem, traktowanie oksycelulozą i adsorpcję na słabo kwaśnym wymienniku kationowym wytworzonym na bazie sztucznej żywicy.

Stwierdzono, że można otrzymać hirudynę o wysokiej czystości i aktywności właściwej około 8400 ATE/mg, jeżeli hirudynę o aktywności właściwej około 4000 ATE/mg rozpuści się w możliwie małej ilości wody destylowanej, na przykład 250 mg w 1 ml wody, po czym roztwór sący się przez kolumnę wypełnioną żelom dekstranowym o silnie usieciowanej budowie eluuje wodę destylowaną, oddziela pierwszą frakcję zawierającą substancje obciążające a następnie z aktywnego eluatu otrzymuje się hirudynę przez liofilizację lub przez strącenie 10-krotną ilością etanolu. Wydajność hirudyny o wysokiej czystości wynosi 80—90%. Do tego

2
procesu można stosować na przykład hirudynę wytworzoną według patentu nr 50094.

Zalety tego sposobu polegają na tym, że oczyszczanie następuje w roztworze wodnym i że przez zwiększenie średnicy kolumny filtracyjnej można oczyścić dowolnie duże ilości hirudyny.

Przykład. 250 mg hirudyny o aktywności właściwej 4420 ATE/mg (jednostki antytrombiny) rozpuszcza się w 1 ml wody i roztwór wprowadza się do kolumny wypełnionej żelom dekstranowym. Najkorzystniejsze wymiary kolumny wynoszą 130 cm × 1 cm. Po przeniknięciu roztworu do warstwy żelu ostrożnie zalewa się warstwą destylowanej wody i wymywa. Szybkość eluowania wynosi 10 ml/godz. Eluat zbiera się w frakcjach co 3 ml. Pierwsze 60 ml zawierają substancje obciążające i tylko bardzo małą część aktywnej hirudyny. Główna ilość hirudyny jest zawarta w następnych 20 ml. Następne frakcje zawierają niskocząsteczkowe zanieczyszczenia bez aktywnej hirudyny. W każdej frakcji oznacza się zawartość proteiny za pomocą spektrometrycznego pomiaru absorpcji przy 280 m długości fali świetlnej. F. Markwardt: Oznaczenie trombiny przez miareczkowanie hirudyny. Arch. farm. 290, 280 (1957). Z wodnego roztworu otrzymuje się hirudynę przez liofilizację lub przez strącenie 10-krotną ilością etanolu. Wydajność wynosi 90% wprowadzonych jednostek ATE. Aktywność właściwa preparatu wynosi około 8400 ATE/mg.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania hirudyny o wysokiej czystości, **znamienny tym**, że hirudynę o aktywności właściwej około 4000 ATE/mg rozpuszcza się w małej ilości wody destylowanej, sączy się przez ko-

lumnę wypełnioną dekstranem o silnie usiecowanej budowie, następnie eluuje wodą destylowaną, odrzuca się pierwszą frakcję zawierającą substancje obciążające, po czym z aktywnego elu-
5 atu otrzymuje się hirudynę przez liofilizację lub przez strącenie etanolem.